



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Control de propiedades antibióticas mediante luz

Autor/es

LIDIA PASTOR PASCUAL

Director/es

DIEGO SAMPEDRO RUIZ

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2017-18



Control de propiedades antibióticas mediante luz, de LIDIA PASTOR PASCUAL (publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de Ciencia y Tecnología

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Photochemical control of antibiotic properties

Realizado por:

Lidia Pastor Pascual

Tutelado por:

Diego Sampedro Ruíz

Logroño, Julio, 2018

Control de propiedades antibióticas mediante luz

Alumna: Lidia Pastor Pascual

Titulación: Grado en Química

Promoción: 2014/2018

Tutor: Diego Sampedro Ruiz



*“Hay tres caminos que llevan a la sabiduría:
La imitación, el más sencillo;
la reflexión, el más noble;
y la experiencia, el más amargo.”*
Confucio

Resumen

En este trabajo fin de grado se ha estudiado la síntesis y comportamiento fotoquímico de compuestos foto-liberables. Estos compuestos se basan en la unión de un sustituyente a un compuesto antibacteriano o derivado de este pertenecientes a la familia de las quinolonas, como son el ácido nalidíxico y el ciprofloxacino. Con la síntesis del compuesto foto-liberable se varía la estructura del agente antibacteriano modificándose su actividad biológica.

Una vez lograda la síntesis se ha realizado un estudio fotoquímico mediante el cual se comprueba si el sustituyente acoplado al antibacteriano es eficazmente liberado al ser irradiado, recuperando la estructura original del compuesto antibacteriano.

Abstract

This final degree Project has focused on the study of the synthesis and photochemical behavior of photo-releasable compounds. These compounds are based on the binding of a substituent to an antibacterial or therefore a derivate of it, which belongs to the quinolone family, as are the nalidixic acid and ciprofloxacin. Synthetizing the photo-releasable compound the structure of the antibacterial is modified and so is it's biological activity.

Once the synthesis is achieved, a photo-chemical study is carried out by means of which it is verified that the substituent is efficiently released when irradiated allowing the antibacterial to recover its structure.

Índice

Resumen	3
Índice	4
Índice de figuras	5
Abreviaciones.....	6
1. Introducción.....	7
2. Antecedentes.....	11
3. Objetivos	14
4. Síntesis y estudio fotoquímico	16
4.1 Síntesis de compuestos foto-liberables.	17
4.2 Espectros UV	19
4.3 Irradiación de los compuestos foto-liberables	23
5. Conclusiones	27
6. Parte experimental	29
6.1 Consideraciones generales	30
6.2 Síntesis del derivado foto-liberable a partir del ácido nalidíxico.....	32
6.3 Síntesis del derivado foto-liberable del ciprofloxacino	35
6.4 caracterización de compuestos foto-liberables	37
7. Anexos	38
7.1 RMN	39
7.2 Espectros de masas.....	41

Índice de figuras

Figura 1: esquema de síntesis y uso de compuestos foto-liberables	9
Figura 2: Ruta sintética realizada para la obtención del compuesto foto-liberable 4 a partir del ciprofloxacino.	17
Figura 3: Ruta sintética realizada para la obtención del compuesto foto-liberable 8 a partir del ácido nalidíxico.	18
Figura 4: espectro UV-Vis del compuesto 2 en CH ₂ Cl ₂	19
Figura 5: espectro UV-Vis del compuesto 4 en CH ₂ Cl ₂	20
Figura 6: espectro UV-Vis del compuesto 5 en DMSO	20
Figura 7: espectro UV-Vis del compuesto 7 en DMSO	21
Figura 8: foto-liberación del compuesto 4	24
Figura 9: foto-liberación del compuesto 7	26
Figura 10: cromatofolio.....	30
Figura 11: embudo cónico de extracción	30
Figura 12: lámpara de mercurio de media presión	30
Figura 13: esquema de un monocromador.....	31
Figura 14: ruta sintética detallada realizada para la obtención del compuesto 7	33
Figura 15: síntesis no satisfactoria del clorhidrato del compuesto 7	34
Figura 16: ruta sintética detallada realizada para la obtención del compuesto 4	36
Figura 17: compuesto 4	37
Figura 18: compuesto 7	37

Abreviaciones

c	Cuatriplete (en RMN)
CCF	Cromatografía de capa fina
^{13}C RMN	Resonancia magnética nuclear de ^{13}C
d	Doblete (en RMN)
dd	Doblete de dobletes (en RMN)
DMSO	Dimetilsulfóxido
^1H RMN	Resonancia magnética nuclear ^1H
h ν	Luz, irradiación, fotones
Hz	Hertzio
J	Constante de acoplamiento (en RMN)
M	Molaridad
m	Multiplete (en RMN)
mmol	Milimol
MS	Espectroscopía de masas
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
q	Cuadruplete (en RMN)
RT	Temperatura ambiente
s	Singlete (en RMN)
t	Triplete (en RMN)
td	Triplete de dobletes (en RMN)
THF	Tetrahidrofurano
UV-Vis	Ultravioleta-visible
δ	Desplazamiento químico
ϵ	Coeficiente de absorción molar
λ	Longitud de onda

1. Introducción

La fotoquímica es la rama de la ciencia encargada del estudio de las transformaciones químicas causadas por la absorción de luz visible, radiación ultravioleta o infrarroja. Los procesos fotoquímicos requieren una reacción química en la cual un fotón es absorbido por un átomo o molécula provocando el paso de éstos fotones a estados excitados aumentando su reactividad.

Las reacciones fotoquímicas son la base de una de las habilidades máspreciadas del ser humano, la visión. Ésta implica la absorción de un fotón por el pigmento visual rodopsina. Por otro lado, mediante reacciones fotoquímicas las plantas son capaces de crear su propio alimento y proveer oxígeno a través de la fotosíntesis.¹

La fotoquímica se basa en tres leyes fundamentales:²

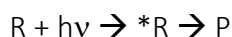
- Ley de absorción de Grotthus-Draper: una radiación no puede causar una acción química si no es absorbida por un cuerpo, solo en ese caso se dará transmisión de energía luminosa.
- Ley energética: para que una radiación luminosa tenga efecto sobre la molécula debe poseer una energía suficiente para generar una transformación química. Una radiación será más energética cuanto más corta sea su longitud de onda.

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

- Ley de la equivalencia fotoquímica o ley de Stark-Einstein: para cada fotón absorbido en un sistema químico corresponde una molécula descompuesta o combinada.

La fotoquímica orgánica molecular es una ciencia centrada en la dinámica de los procesos que resultan de las interacciones de moléculas orgánicas con luz. Este campo de la fotoquímica se centra en las variaciones de estructuras orgánicas tras su irradiación y será esto el principal enfoque de este trabajo de fin de grado.

La fotoquímica orgánica se basa en procesos del tipo



donde R es una molécula orgánica la cual absorbe un fotón ($h\nu$) y pasa a un estado excitado *R , a partir del cual se generarán unas variaciones químicas que formarán P.³

¹ Engel. M & Reid. P. (2006). *Química Física*. Madrid: Pearson Education.

² Wardle. B. (2009) *Principles and applications of photochemistry*. Chichester, West Sussex, U.K. Wiley

³ Turro. N. J, Ramamurthy. V & Scaiano. J. C. (2009). *Principles of Molecular Photochemistry An Introduction*. Sausalito, California: University Science Books.

Durante este trabajo se usará la foto-liberación de compuestos. Los compuestos sintetizados se componen por de una parte bioquímicamente activa, que será un antibiótico. En este caso se ha trabajado con un derivado del ciprofloxacino y con el ácido nalidíxico. La otra parte del compuesto será un grupo foto-liberable encargado de inhibir la actividad del antibiótico al acoplarse a este. Mediante la irradiación de luz se desacopla el sustituyente foto-liberable recuperándose la forma activa del antibiótico o derivado.⁴

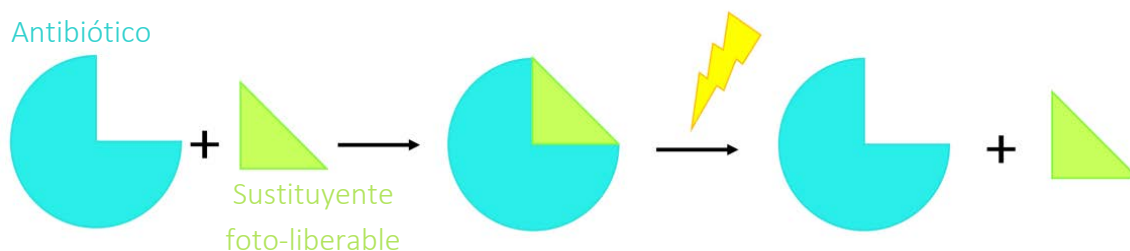


Figura 1: esquema de síntesis y uso de compuestos foto-liberables

Los antibióticos son medicamentos empleados para prevenir y tratar infecciones bacterianas pero el uso de antibióticos de manera prolongada o sin control médico puede generar una resistencia en el organismo provocando que la eficacia del antibiótico se minimice y no se erradiquen las bacterias con la misma eficiencia. Las bacterias tienen la capacidad de mutar para impedir el efecto de los antibióticos y sobrevivir su ataque.⁵ Gracias a la aplicación de la foto-liberación se reduce la capacidad de generar esta resistencia a los antibióticos focalizando el ataque de estos evitando así una distribución del antibiótico por zonas no afectadas del organismo.

Esta capacidad de las bacterias de sobrevivir al ataque antibiótico es hoy en día una de las mayores amenazas para la salud mundial. Las modificaciones de las bacterias para resistir al ataque de los antibióticos han progresado y se dan cada vez con mayor velocidad y efectividad, de modo que pese a la toma de antibióticos las bacterias continúan reproduciéndose y afectando al organismo.

Otro problema importante derivado del abuso de los antibióticos a parte de la resistencia ya comentada es el efecto que producen en todo el organismo del ser vivo que lo ingiere y no solo en las células bacterianas, el abuso de antibióticos puede causar problemas en el aparato digestivo, jaquecas o dolores de cabeza, mayor riesgo de sufrir gripe e incluso alteraciones en el sistema nervioso.

⁴ Velema. W. A, van der Berg. J. P, Szymanski. W, Driessen. A. J. M & Feringa. B. L. (2014) *ACS Chem. Biol.* 9, 1969.

⁵ Wellington. E. M, Boxall. A. B, Cross. P, Feil. E. J, Gaze. W. H, Hawkey. P. M, Johnson-Rollings. A.S, Jones. D. L, Lee. N. M, Otten. W, Thomas. C. M & Williams. A. P. (2013). *Lancet Infect. Dis*, 13,155

Los antibióticos pueden actuar mediante dos mecanismos principalmente:

- Destruyendo la membrana de la bacteria y provocando su descomposición.
- Impidiendo los procesos vitales o la reproducción del material genético de la bacteria causando su muerte, este último será el proceso empleado por las quinolonas, familia de antibióticos que se usará en este trabajo.

De este modo los antibióticos son capaces de acabar con determinadas bacterias, pero al encontrarse en el torrente sanguíneo causar la resistencia de otras bacterias que supongan una infección todavía más peligrosa, por ello un ataque más dirigido de los antibióticos a las zonas de mayor concentración de las bacterias que se quiere eliminar sería mucho más seguro y conveniente.

2. Antecedentes

Un antibiótico es una sustancia química generada por un ser vivo o sintéticamente, que mata (bactericida) o inhibe la reproducción (bacteriostático) de microorganismos. Son empleados contra infecciones bacterianas.

A principios del siglo XX el bacteriólogo alemán Rudolf von Emmerich descubre un preparado capaz de destruir las bacterias de cólera, pero no capaz de acabar con la enfermedad. En 1909 Paul Erlich consigue el salvarsán, un compuesto de arsénico capaz de matar selectivamente las espiroquetas, bacterias causantes de la sífilis, sin lesionar al organismo huésped. Este fue el único tratamiento eficaz contra la sífilis hasta 1940 cuando se purificó la penicilina.

El termino antibiótico fue empleado por primera vez por Selman Waksman en 1942 para describir aquellas sustancias generadas por microorganismos capaces de matar otros microorganismos.⁶

A pesar de estos antecedentes se considera que los antibióticos comienzan en 1928 cuando Alexander Fleming descubre la penicilina, aunque tarda 10 años en poder ser concentrada y empleada como tal.

El primer antibiótico empleado en humanos fue usado en 1939, la tirotricina aislada por René Dubos tenía un uso exclusivamente tópico por su alta toxicidad.

Durante este trabajo se utilizan dos antibióticos derivados de la estructura de las quinolonas, el ciprofloxacino y el ácido nalidíxico.

Las quinolonas son una familia de agentes sintéticos conocidos desde la década de los 60, que poseen carácter antimicrobiano. Su núcleo estructural posee un anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoína, a este núcleo se le añaden modificaciones que varían sus propiedades y por ello dentro de este tipo de estructura se dividen cuatro generaciones diferentes.⁷

- Primera generación, usados exclusivamente como antisépticos urinarios ya que son sencillamente eliminados por la orina en forma activa.
- Segunda generación: son denominadas también fluoroquinolonas. Su rango de aplicación es más amplio.
Esta generación puede dividirse en dos subcategorías:
 - Norfloxacin, enoxacin y lomefloxacina, los cuales poseen actividad contra las enterobacterias y pseudomona aeruginosa, pero tan solo actúan en el tracto urinario.

⁶ Zakeri, B. & Lu, T. K. (2013). Synthetic biology of antimicrobial discovery. *ACS Synthetic Biology*, **2**(7), 358-372.

⁷ Andersson, M. I & MacGowan, A. P. (2003). "Development of the quinolones". *J. of A. Chem.* **51** (Suppl. S1): 1–11.

- Ciprofloxacino y ofloxacina, con actividad contra enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y gérmenes atípicos, tienen acción a nivel tanto sistémico como urinario.
- Tercera generación, surgen ante la necesidad clínica de un rango más amplio antibacteriano, buscando específicamente un efecto contra las bacterias gram-positivas.⁸
- Cuarta generación: en este caso se buscaba una ampliación de espectro contra los organismos anaerobios, preservando las ampliaciones de la tercera generación.

El ciprofloxacino es un antibiótico de la segunda generación de las quinolonas (1987) empleado para infecciones urinarias o neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Este antibiótico paraliza la replicación del ADN bacterial al acoplarse al ADN girasa que desenrolla la doble hélice impidiendo la división celular y provocando la muerte de la bacteria.⁹

El ácido nalidíxico es un agente antimicrobiano de la primera generación de las quinolonas empleado únicamente en infecciones urinarias causadas por bacterias gram-negativas. Fue la primera quinolona empleada en clínica en 1962. Según la concentración de nalidíxico empleada este actúa como bacteriostático, simplemente inhibiendo la reproducción bacteriana o como bactericida, matando la bacteria.¹⁰

⁸ Zhang, G, Zhang, S, Pan, B, Liu, X, & Feng, L. (2018). 4-quinolone derivatives and their activities against gram-positive pathogens. *E. J. of Med. Chem.*, 143, 710-723.

⁹ Andriole, V. T. (1989) *The Quinolones*. Academic Press

¹⁰ Leshner, G. Y, Froelich, E. J, Gruett, M. D, Bailey, J. H & Brundage. (1962) *R. P. J. Med. Pharm. Chem.* 5, 1063-1065.

3. Objetivos

En este trabajo fin de grado se pretenden conseguir varios objetivos.

- Síntesis de nuevos compuestos formados por un antibiótico o derivado de este y un grupo foto-liberable.
- Estudio fotoquímico de los nuevos compuestos sintetizados que permitan evaluar sus características como posibles antibióticos foto-liberables.
- Síntesis de compuestos solubles en agua lo cual permita que los ensayos biológicos sean más accesibles puesto que el agua tiene interferencias mínimas, en comparación con otros disolventes, con los microorganismos.

4. Síntesis y estudio fotoquímico

4.1 Síntesis de compuestos foto-liberables.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de los compuestos foto-liberables partiendo de quinolonas de primera y segunda generación.

La ruta sintética descrita a continuación parte de la quinolona de segunda generación ciprofloxacino (compuesto **1**). El ciprofloxacino contiene un grupo ácido crítico en su actividad biológica, la sustitución de esta parte ácida permite regular la actividad biológica del ciprofloxacino.

La síntesis comienza con la protección del ciprofloxacino, de esta manera se aumenta la solubilidad del antibiótico y se evita la formación de productos secundarios durante la síntesis. A partir del compuesto **2** se sintetiza el cloruro del ácido dando el compuesto **3** el cual permite el acoplamiento del sustituyente foto-liberable (compuesto **8**) generando el compuesto final **4**.

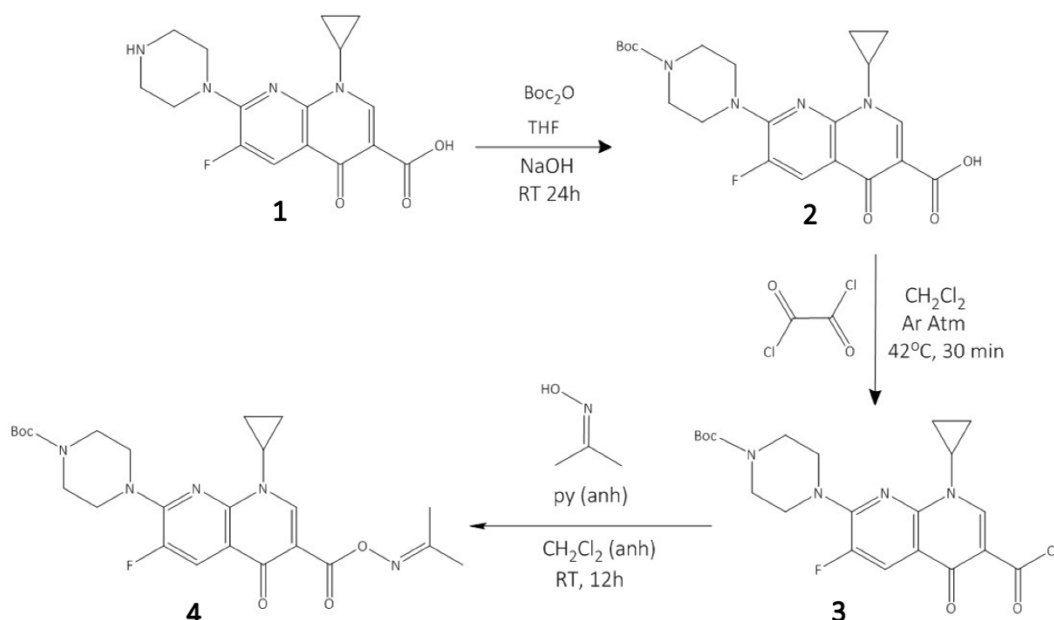


Figura 2: Ruta sintética realizada para la obtención del compuesto foto-liberable **4** a partir del ciprofloxacino.

En segundo lugar, se sintetizó a partir del ácido nalidíxico, quinolona de primera generación, el segundo compuesto foto-liberable. La parte ácida del compuesto **5** nos permite regular su actividad biológica siendo modificada.

Se comienza la síntesis formando el cloruro del ácido nalidíxico (compuesto **6**) al cual se agrega el sustituyente foto-liberable (compuesto **9**) para dar el compuesto final **7**.

Una vez obtenido el compuesto **7** se comprueba que no es suficiente mente soluble en CH_2Cl_2 como para realizar los RMN por ello se disuelve en DMSO.

El DMSO es un disolvente viable en este caso puesto que en concentraciones inferiores al 5% no interfiere con los organismos. También hay que añadir que el DMSO disminuye la resistencia bacteriana a los antibióticos.¹¹

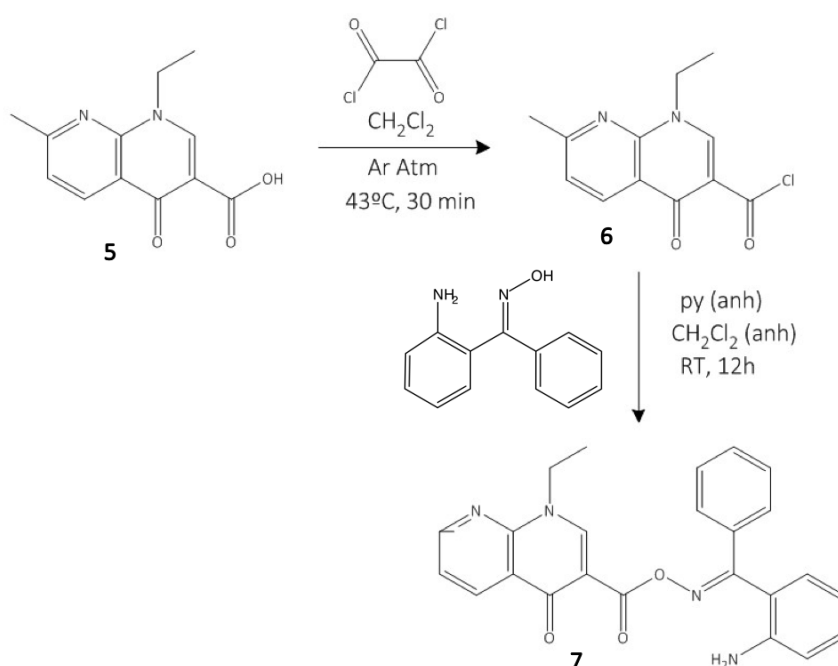


Figura 3: Ruta sintética realizada para la obtención del compuesto foto-liberable **8** a partir del ácido nalidíxico.

¹¹ DMSO: una sustancia útil en diversas patologías, cáncer incluido. (2018). Tomado de: <https://www.dsalud.com/reporte/dmsoluna-sustancia-util-en-diversas-patologias-cancer-incluido> Revisado el 20/07/18 11:30 A.M.

4.2 Espectros UV

Finalizada la síntesis de los compuestos foto-liberables se procede a realizar sus espectros de absorción. Para ello se preparan disoluciones de concentración de en torno a $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de cada uno de los compuestos. Para realizar las medidas se emplea una cubeta de cuarzo de 1cm de paso óptico.

En el caso del compuesto **2** y **4** se añade ácido para tratar de protonar el compuesto y comprobar si surgen nuevas bandas o se desplazan las existentes.

A continuación, se muestran los espectros de absorción de los precursores usados para la síntesis de los compuestos foto-liberables, así como los espectros de estos últimos.

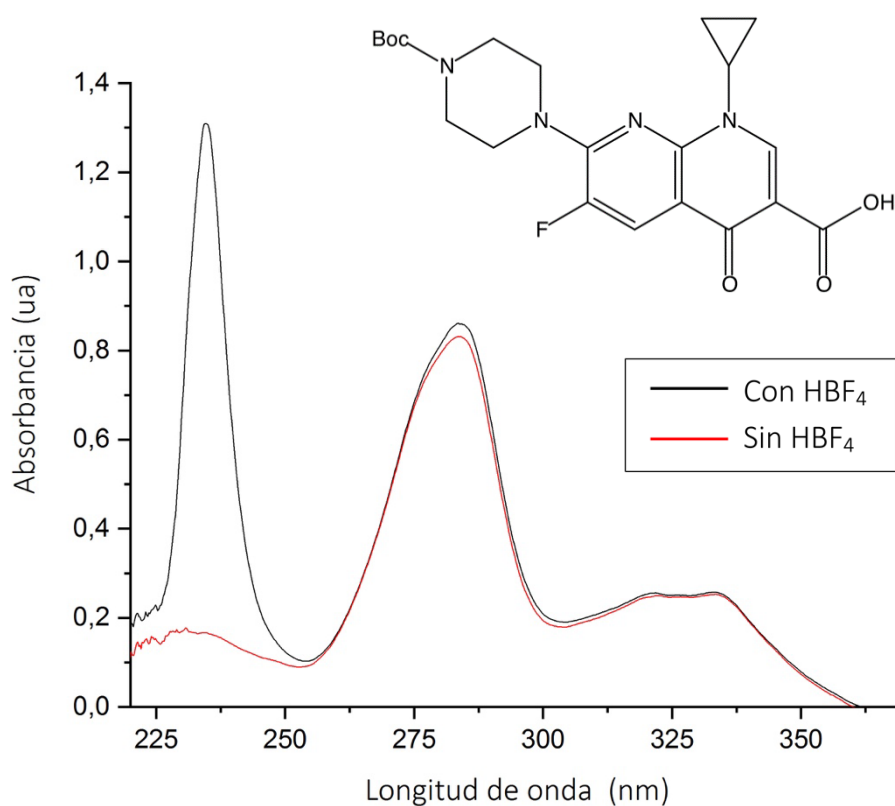


Figura 4: espectro UV-Vis del compuesto **2** en CH_2Cl_2

Al agregar 1 equivalente de ácido HBF_4 al compuesto **4** surge una banda a 237 nm con un máximo en 1.3ua.

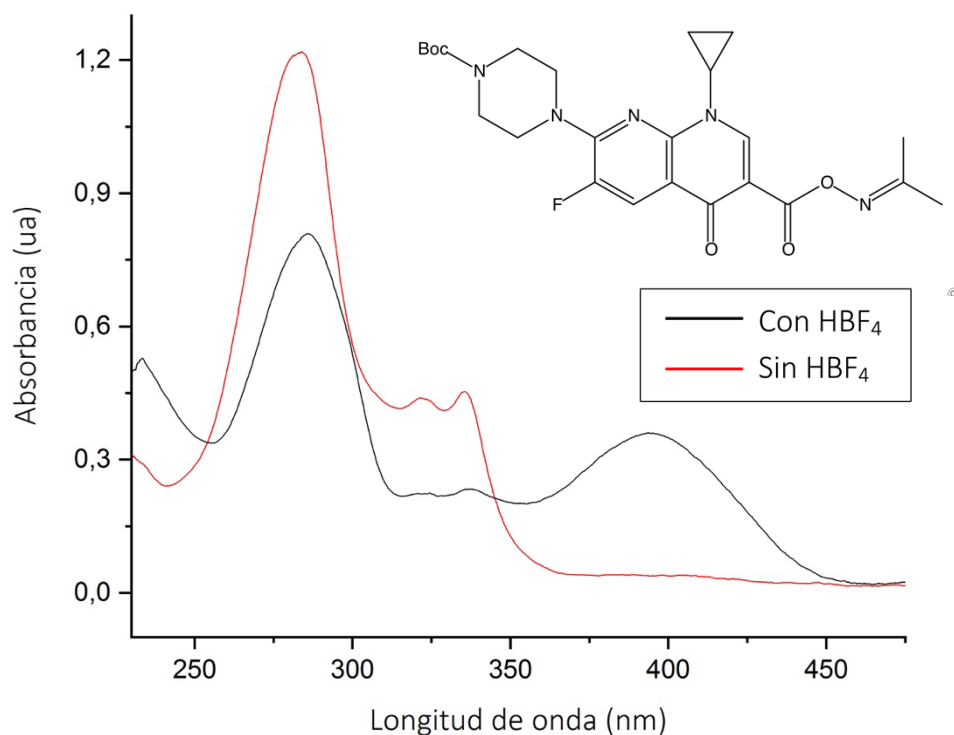


Figura 5: espectro UV-Vis del compuesto **4** en CH₂Cl₂.

La banda a 275 nm decrece con la adición de 1 equivalente ácido HBF₄ de 1.2 a 0.75 ua y se forma una nueva banda a 400nm de 0.3ua.

Como se observa la aparición del ácido provoca la formación de bandas en el visible en ambos casos.

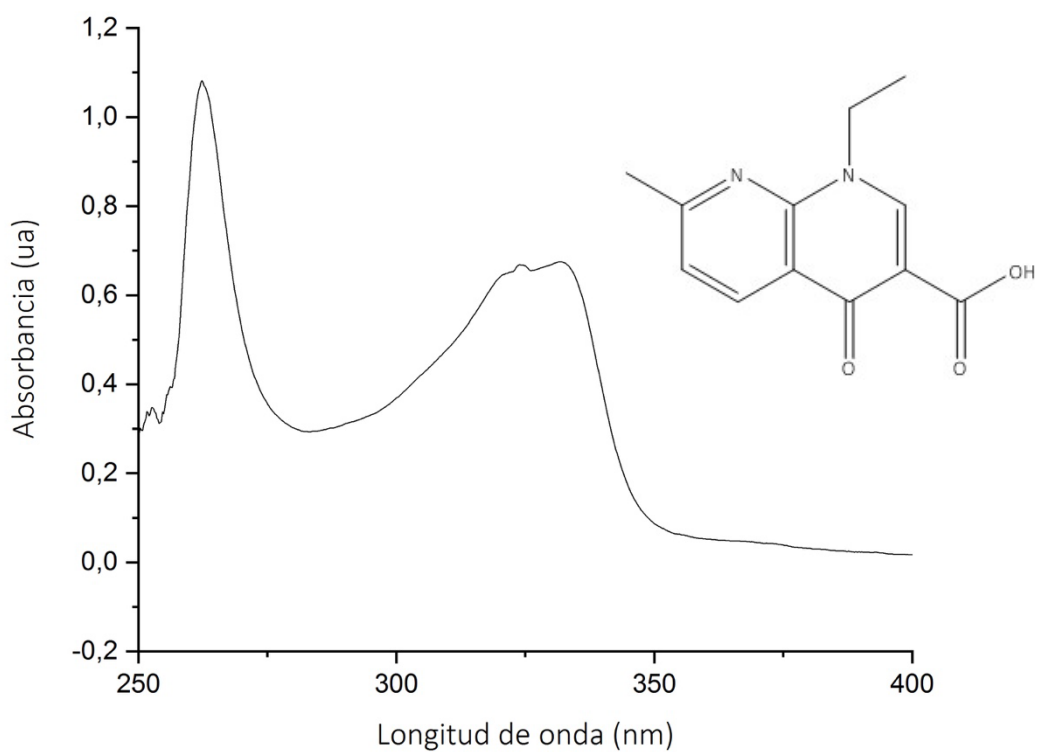


Figura 6: espectro UV-Vis del compuesto **5** en DMSO

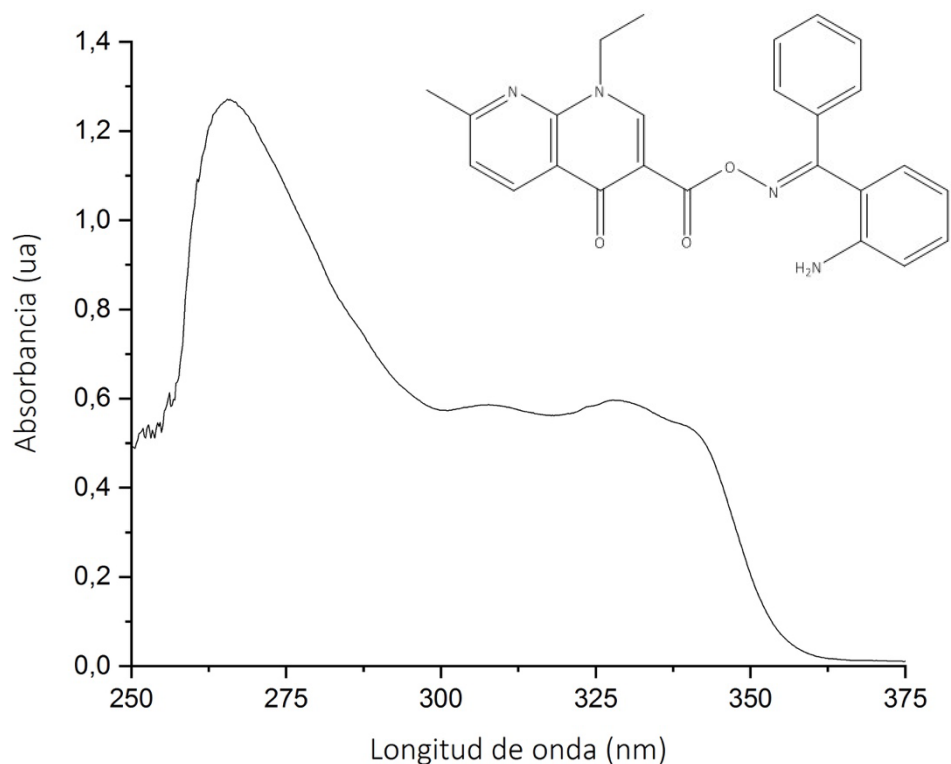


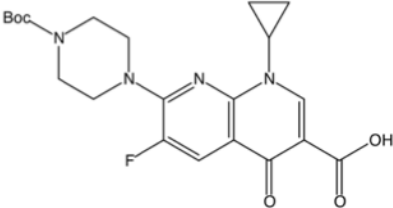
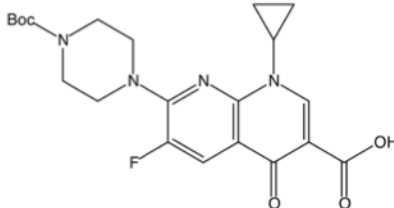
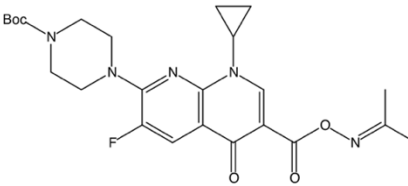
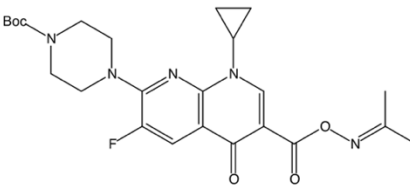
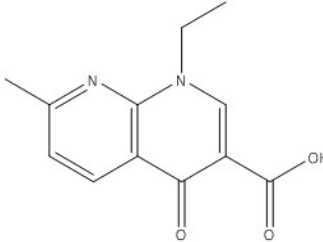
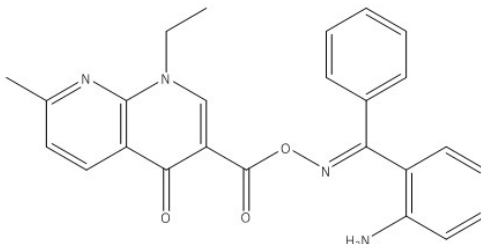
Figura 7: espectro UV-Vis del compuesto 7 en DMSO

Al agregar el sustituyente foto-liberable al compuesto 5 desaparece la de 325nm se superpone con otra banda proveniente del grupo protector.

Tras realizar los espectros ultravioletas y ver la posición de las bandas obtenidas se ha decidido utilizar una lámpara de mercurio de media presión de 125W para irradiar los compuestos foto-liberables.

4. Síntesis y estudio fotoquímico

Tabla 1: Valores de coeficiente de extinción molar para las bandas de máxima absorción

Compuesto	λ (nm)	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)
 + HBF ₄	285	17000.00
	285	16600.00
 + HBF ₄	285	19251.34
	285	32085.56
	262	24229.07
	265	28193.83

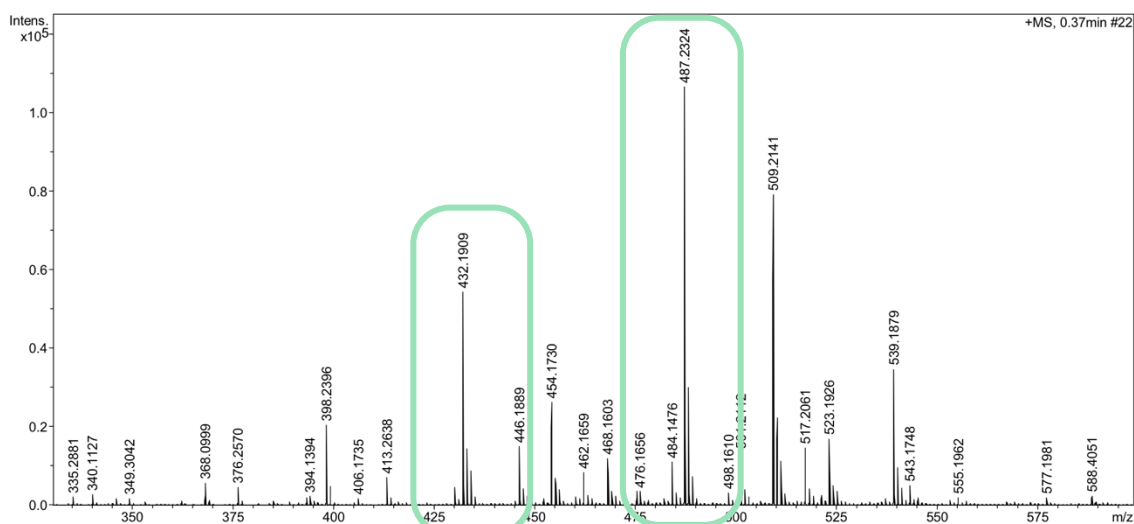
4.3 Irradiación de los compuestos foto-liberables

Una vez obtenidos y analizados los espectros ultravioletas se procede a la irradiación de los compuestos **4** y **7** con la lámpara de Hg de media presión. Los compuestos se irradian disueltos en un tubo de RMN de Pyrex. En el caso del compuesto **4** se empleará CDCl_3 y para el compuesto **7** DMSO, dado que su solubilidad en CDCl_3 no es suficiente para llevar a cabo RMN.

- Irradiación del compuesto **4**: es seguida mediante espectrometría de masas, puesto que en RMN las señales desaparecen debido a la descomposición del producto.

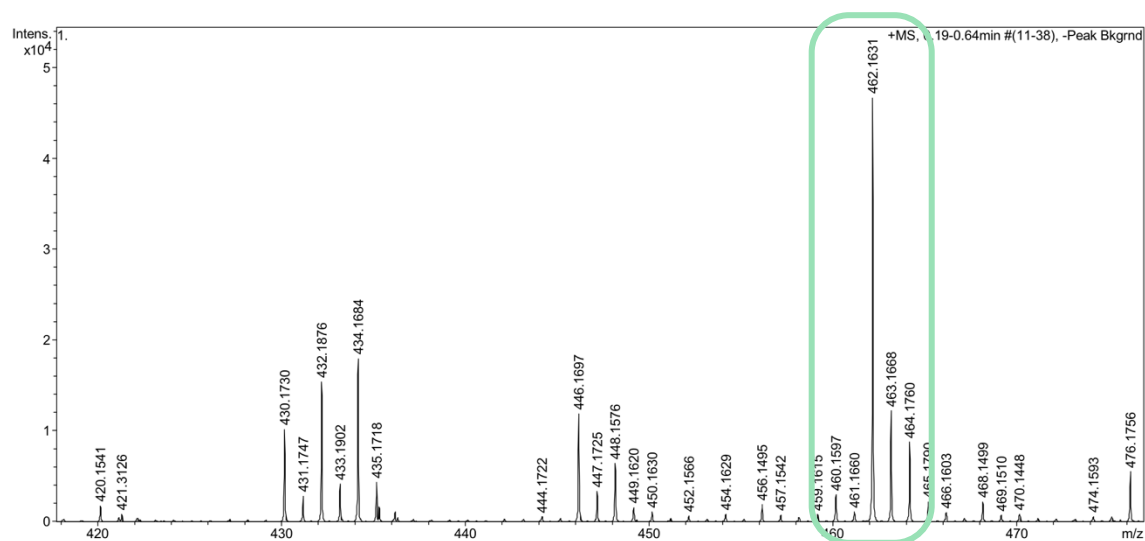
A continuación, se muestran los espectros de masas realizados a diferentes tiempos de irradiación:

- 10 minutos de irradiación



Tras 10 minutos de irradiar el compuesto **4** se observa como predomina la masa 487.2324 perteneciente al ester de oxima, al compuesto **4**. Esto indica que continúa habiendo un gran porcentaje de compuesto sin haberse dado foto-liberación, pero también se observa la aparición de un pico 432.1909 el cual se relaciona con el compuesto **2** e indica que si se ha producido un porcentaje de liberación del antibiótico empleado.

- 20 minutos de irradiación



Tras irradiar 20 minutos prevalece una banda de masa 462.1631, esto nos indica que pese a que en el espectro indicado a los 10 minutos de irradiar comenzaba a producirse una foto-liberación del compuesto, a los 20 minutos se han formado subproductos no deseados debidos a la irradiación tan energética, el compuesto **4** ha pasado a descomponerse ya que la señal de 432.1909 ha desaparecido.

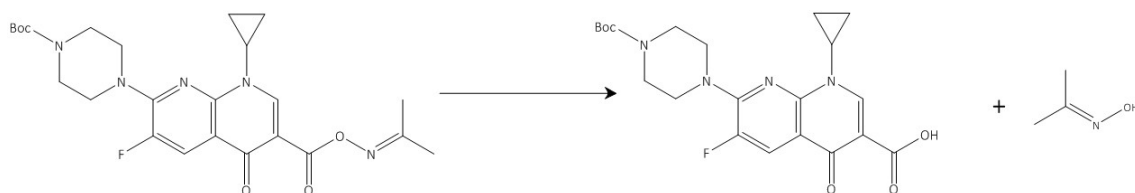


Figura 8: foto-liberación del compuesto **4**

- Irradiación del compuesto **7**: se lleva a cabo un seguimiento de la irradiación mediante RMN usando DMSO- d_6 . Se realizan medidas de RMN en intervalos breves de tiempo de modo que se vaya apreciando el cambio de señales que provoca la liberación del sustituyente acoplado, en este caso el compuesto **9**.

A continuación, se muestran las variaciones de los espectros de RMN obtenidos durante la irradiación:

- 0 minutos de irradiación

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6)

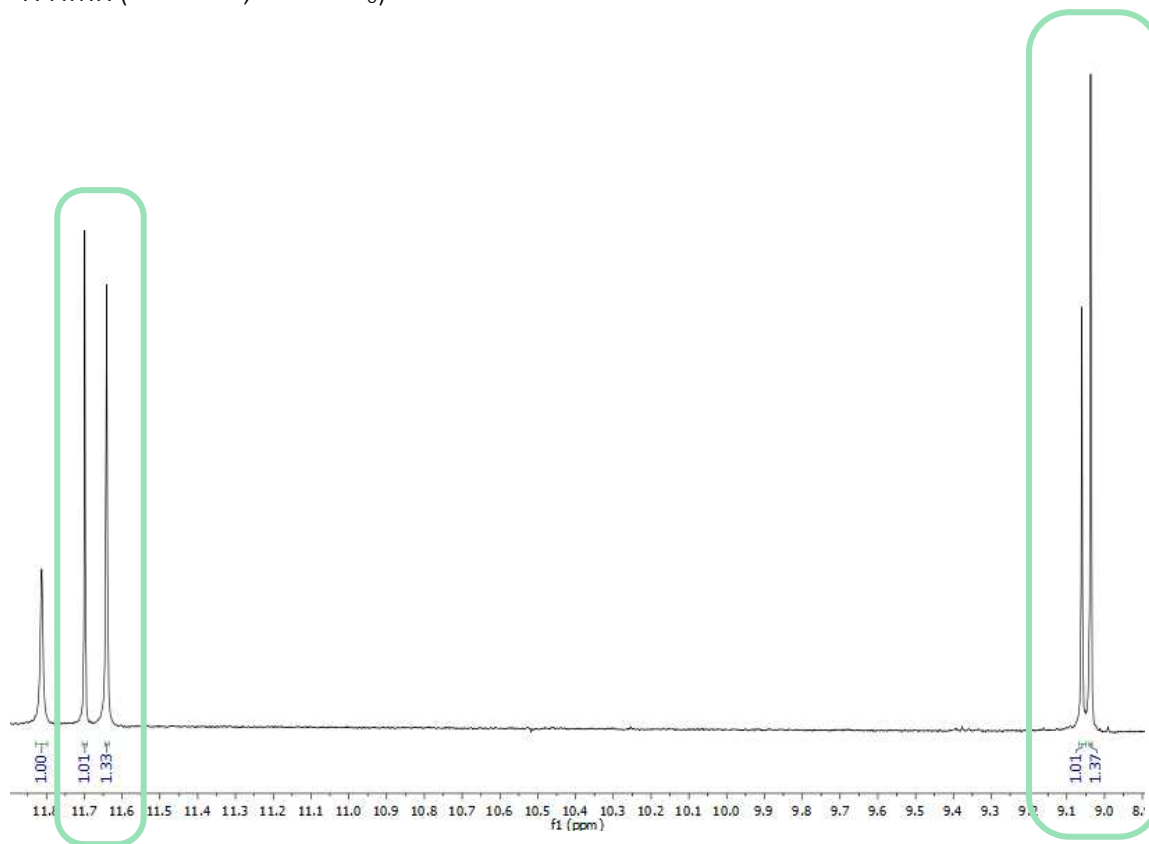


A tiempo 0 observamos como en esta zona del espectro de 11.9-8.9 ppm hay tres singletes que integran por 1 hidrogeno cada uno.

Teniendo este RMN como referencia la muestra se irradia durante 120 minutos y se realiza otro RMN para comprobar si las señales varían y si estas variaciones nos indican foto-liberación del compuesto **7**.

- 120 minutos de irradiación

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6)



Tras la irradiación se observa como aumentan dos picos a 11.65 ppm y 9.03 ppm los cuales se pueden observar en el espectro de tiempo 0 con un tamaño muy pequeño, con la irradiación estos picos aumentan su tamaño indicando la liberación progresiva del sustituyente foto-liberable **9**.

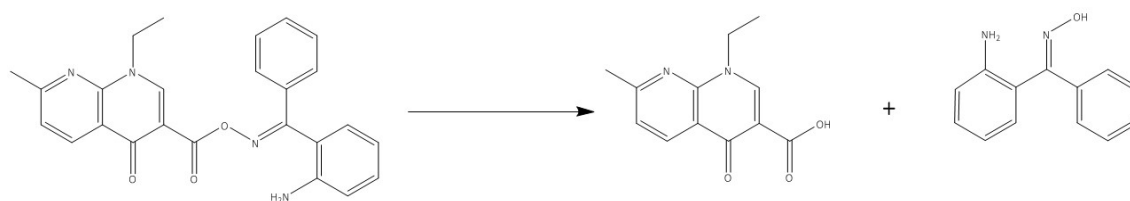


Figura 9: foto-liberación del compuesto **7**

Como hemos visto tanto el compuesto **4** como el **7** responden a la irradiación desacoplando el antibiótico del compuesto foto-liberable, la liberación no es total en el compuesto **7** pero si suficiente como para indicar variación de señales en el espectro de RMN y en el caso del compuesto **4** con la prolongación en el tiempo de la irradiación este pasa a descomponerse.

5. Conclusiones

En este trabajo de fin de grado se ha estudiado la síntesis e irradiación de compuestos foto-liberables.

Las conclusiones obtenidas durante la realización de este trabajo se detallan a continuación:

- La síntesis de ambos compuestos foto-liberables, **7** y **4**, ha sido exitosa.
- Ambos compuestos foto-liberables responden a la irradiación, en el caso del compuesto **7** el sustituyente foto-liberable se desacopla del antibiótico o derivado usado en la síntesis, en el compuesto **4** el producto se descompone.
- Se ha tratado de preparar el clorhidrato de los compuestos **4** y **7** para tratar de mejorar la solubilidad de los compuestos en agua, pero la síntesis no ha sido satisfactoria, pese a ello los compuestos **4** y **7** son solubles en DMSO. Por ello debería continuarse con el estudio de otras vías de mejora de solubilidad.¹² Posibles vías alternativas para esta mejora de la solubilidad en fármacos que se están usando en la actualidad son:
 - Uso de codisolventes como polietilenglicoles de bajo peso molecular y propilenglicol combinados con agua.
 - Agente acomplejantes como ciclodextrinas que permitan la formación de complejos de inclusión solubles en agua.
 - Uso de excipientes hidrófilos como polivinilpirrolidinas capaces de ser portadores del fármaco para preparar dispersiones sólidas.

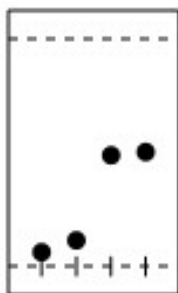
¹² Zhi. L, Asim. S & Paul. H. (2015) Overview if milling techniques for improving the solubility of poorly wáter-soluble drugs. *Asian Journal of Farmaceutical Science*. 10, 255-274

6. Parte experimental

6.1 Consideraciones generales

Cromatografía de columna:

Se ha empleado gel de sílice como fase estacionaria usando los eluyentes requeridos en cada caso.



Cromatografía de capa fina

Para el seguimiento de las reacciones llevadas a cabo se han empleado cromatofolios de 0,20mm de espesor de gel de sílice con un eluyente dependiente de la reacción seguida y un indicador F_{254} de ultravioleta.

Figura 10: cromatofolio

Extracción:

Mediante embudo de decantación de vidrio de forma cónica con llave en la parte inferior. Se separan las fases orgánica y acuosa empleando los disolventes adecuados en cada ocasión para lavar la fase acuosa.



Figura 11: embudo cónico de extracción

Resonancia magnética nuclear:

Se han realizado experimentos de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C en un equipo Bruker-ARX-300, usando como disolventes DMSO o CDCl_3 .

Los desplazamientos químicos son indicados mediante δ en ppm y las multiplicidades son expresadas como singlete (s), doblete (d), triplete (t), triplete de dobletes (td), cuádruplete (q) o múltiplete (m).

Espectroscopia de masas:

Realizados en un equipo HP5989B con interfase de electrospray HP 59987A

Instrumental fotoquímico:

Se ha irradiado mediante el empleo de lámpara de mercurio de media presión de 125W.

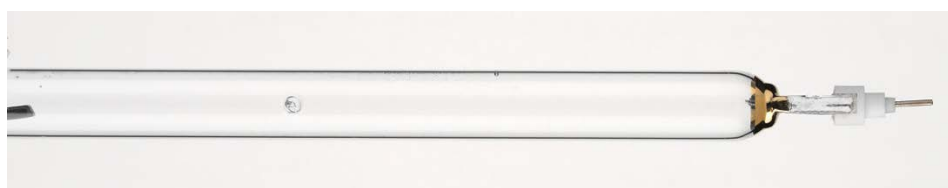


Figura 12: lámpara de mercurio de media presión

También se ha probado la irradiación mediante monocromador. Un monocromador es un dispositivo óptico que mide la composición de la luz de acuerdo con su distribución de longitudes de onda a partir de una fuente o lámpara que produzca una amplia gama de longitudes de onda.

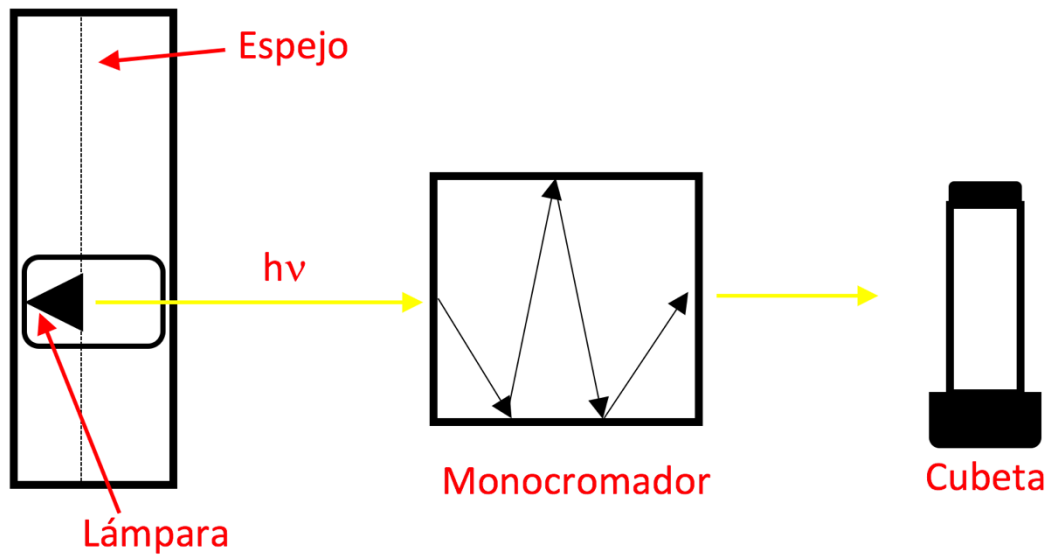


Figura 13: esquema de un monocromador

6.2 Síntesis del derivado foto-liberable a partir del ácido nalidíxico

Los pasos seguidos durante la síntesis del compuesto 8 de manera más precisa son los siguientes:

- Síntesis del compuesto **9**:

Se disuelve 1 equivalente de 2-amino benzofenona y 5 equivalentes de cloruro de hidroxilamonio en agua desionizada.

Se agregan 25 equivalentes de piridina y se agita la reacción a reflujo a 100°C durante 8h.

La reacción se sigue mediante CCF con un eluyente 10:1 diclorometano/acetato de etilo. Una vez finalizada la reacción se extrae con HCl (1X 30ml) y H₂O (2x50ml).

Se elimina el disolvente de las fases orgánicas extraídas mediante rotavapor y se seca el producto a vacío.

Se purifica el sólido obtenido mediante cromatografía de columna 10:1 diclorometano/acetato de etilo.

- Síntesis del compuesto **6**:

Se disuelve 1 equivalente del compuesto **5** en diclorometano y se le agregan 3 equivalentes de cloruro oxálico. Se agita la reacción durante 30 minutos a reflujo en atmósfera de argón. Se elimina el disolvente mediante rotavapor y se deja secar el compuesto a vacío.

- Síntesis del compuesto **7**:

Bajo condiciones de atmósfera de argón se disuelve 1 equivalente del compuesto **6** en diclorometano anhidro y se le agrega 1 equivalente del compuesto **9** disuelto en diclorometano anhidro. Se añaden 2 equivalentes de piridina anhidra y se agita la reacción a temperatura ambiente durante 12 horas. El producto se purifica mediante cromatografía de columna 10:1 diclorometano/acetato de etilo.

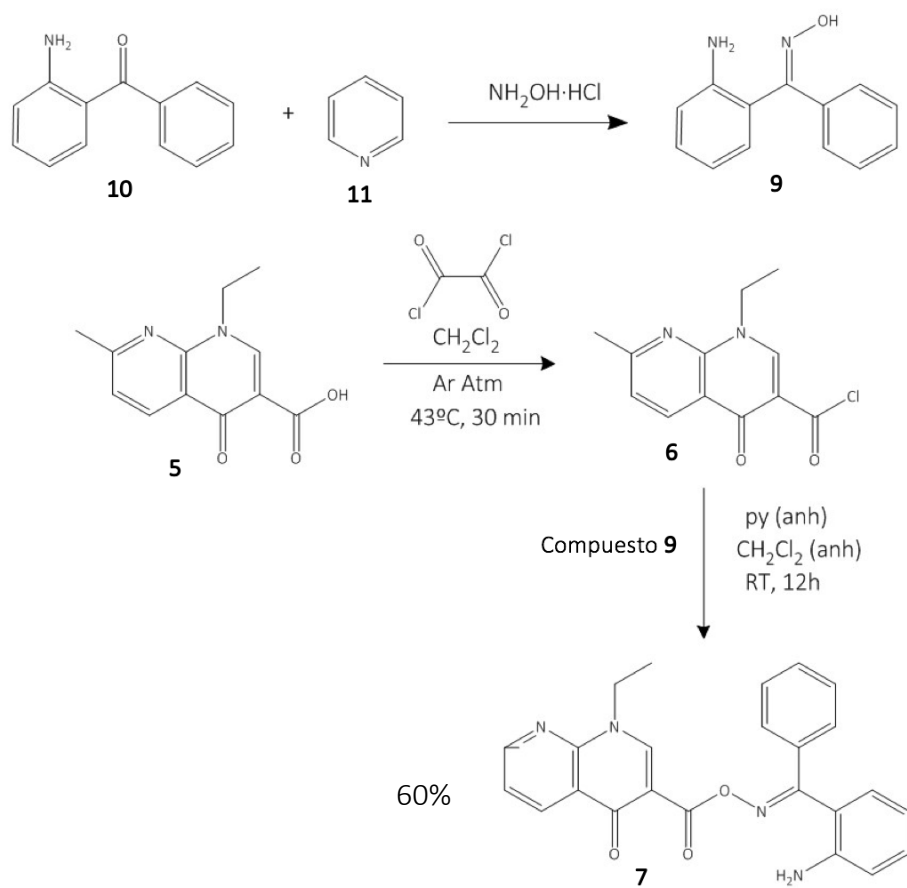


Figura 14: ruta sintética detallada realizada para la obtención del compuesto **7**

Tras la obtención del compuesto foto-liberable se trata de sintetizar el clorhidrato del compuesto **7** para promover la solubilidad en agua de estos compuestos foto-liberables. La solubilidad de estos compuestos facilita su aplicación biológica y su estudio en microorganismos.

Esta síntesis del clorhidrato se lleva a cabo mediante la siguiente reacción la cual no sucede de manera satisfactoria, el compuesto **7** se descompone.

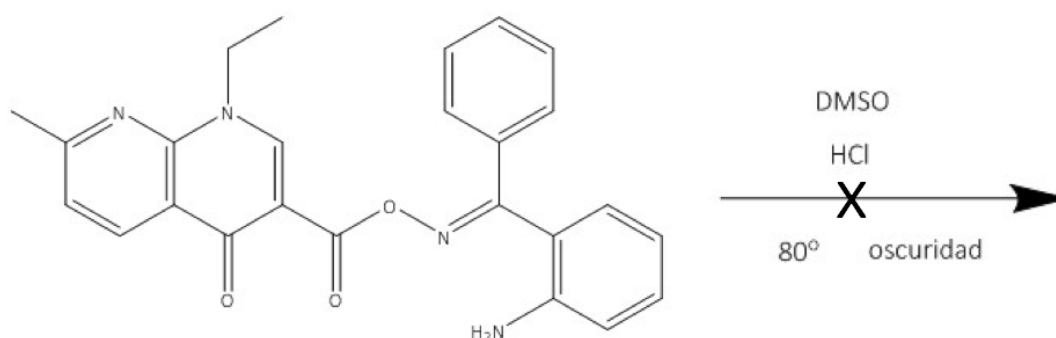


Figura 15: síntesis no satisfactoria del clorhidrato del compuesto **7**

Tratando de llevar a cabo la reacción anterior satisfactoriamente las condiciones de reacción utilizadas fueron variadas, se comenzó con oscuridad y temperatura ambiente en dioxano, tras comprobar que la reacción no se producía se aumentó la temperatura, pero esto tampoco daba los resultados requeridos por lo que se cambió el disolvente a DMSO y el compuesto no solo no reaccionaba si no que se descomponía.

6.3 Síntesis del derivado foto-liberable del ciprofloxacino

- Síntesis del compuesto **8**:

Se disuelve 1 equivalente de hidróxido de sodio en agua desionizada y se mezcla con 3 equivalentes de cloruro de hidroxilamonio disueltos en agua desionizada. Se adiciona a la mezcla 1 equivalente de acetona disuelta en etanol.

La reacción se agita con reflujo durante 4 horas.

El crudo de reacción se extrae con éter (3x80ml). La fase orgánica se seca con NaSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en rotavapor. El compuesto se deja secar a vacío.

- Síntesis del compuesto **2**

Se disuelve 1 equivalente de compuesto **1** en THF, se añaden 1.1 equivalentes de di-*tert*-butil dicarbotato y 2 equivalentes de hidróxido de sodio 1M. La reacción se agita a temperatura ambiente 12 horas.

Se elimina el THF mediante rotavapor y se extrae la fase acuosa con CH₂Cl₂ (3x50ml)

- Síntesis del compuesto **3**

Se disuelven 1 equivalente del compuesto **2** en diclorometano y se le agregan 3 equivalentes de cloruro oxálico.

Se agita la reacción durante 30 minutos a reflujo en atmósfera de Argón.

Se elimina el disolvente mediante rotavapor y se deja secar el compuesto a vacío.

- Síntesis del compuesto **4**

En condiciones de atmósfera de Argón se disuelve 1 equivalente del compuesto **3** en diclorometano anhidro y se le agrega 1 equivalente del compuesto **8** disuelto en diclorometano anhidro. Se añade 1 equivalente de piridina anhidra y agitamos la reacción a temperatura ambiente durante 12 horas. El producto se purifica mediante cromatografía de columna 5:0.5 diclorometano/metanol.

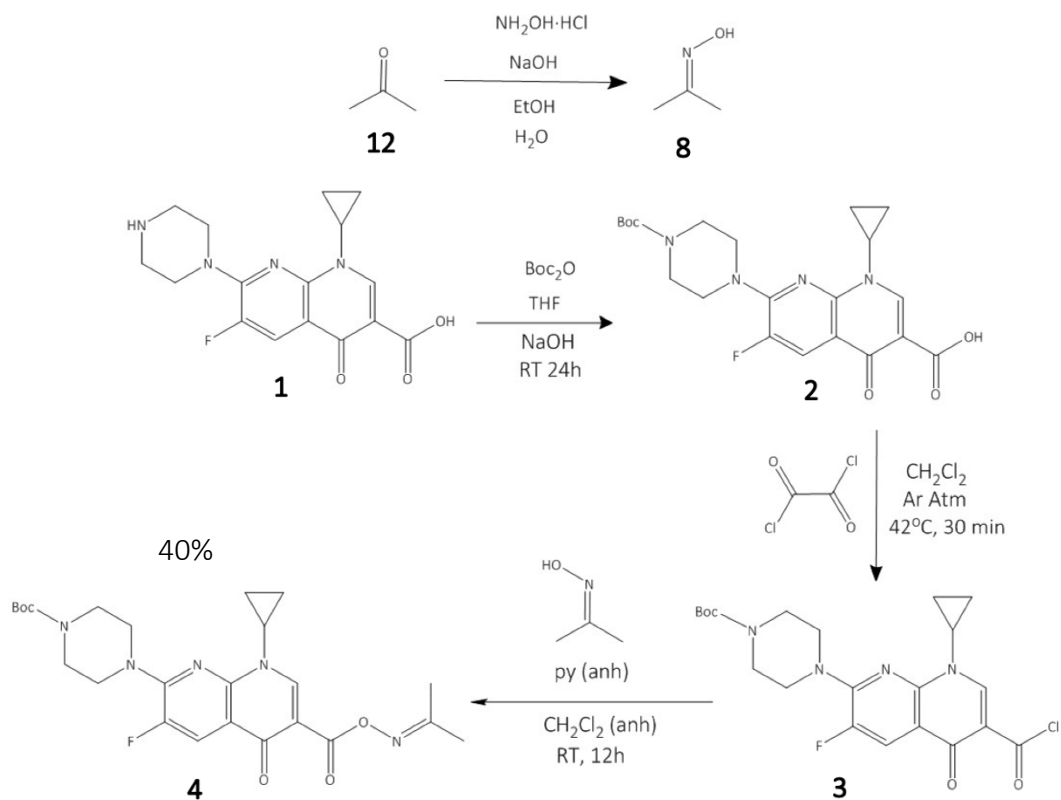


Figura 16: ruta sintética detallada realizada para la obtención del compuesto **4**

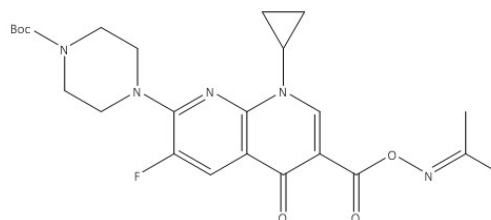
6.4 caracterización de compuestos foto-liberables

Compuesto **4**:Fórmula: C₂₄H₃₀FN₅O₅

Masa teórica: 487.22 g/mol

Masa exacta: 487.2325 g/mol

Rendimiento: 40%

Figura 17: compuesto **4**

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.64 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.67 – 3.62 (m, 6H), 3.43 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.49 (s, 9H), 1.33 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H).

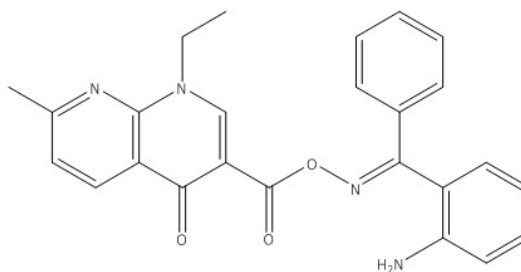
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.94 (s), 172.91 (s), 165.14 (s), 164.69 (s), 155.22 (s), 154.74 (s), 151.93 (s), 149.14, 144.70, 144.56, 138.20, 123.59, 123.50 (s), 113.75 (s), 113.45 (s), 109.77 (s), 105.24 (s), 80.36 (s), 50.07 (s), 34.75 (s), 29.83 (s), 28.55 (s), 21.95 (s), 18.27 (s), 8.41 (s).

Compuesto **7**:Fórmula: C₂₅H₂₂N₄O₃

Masa teórica: 426.17 g/mol

Masa exacta: 427.1765 g/mol

Rendimiento: 60%

Figura 18: compuesto **7**

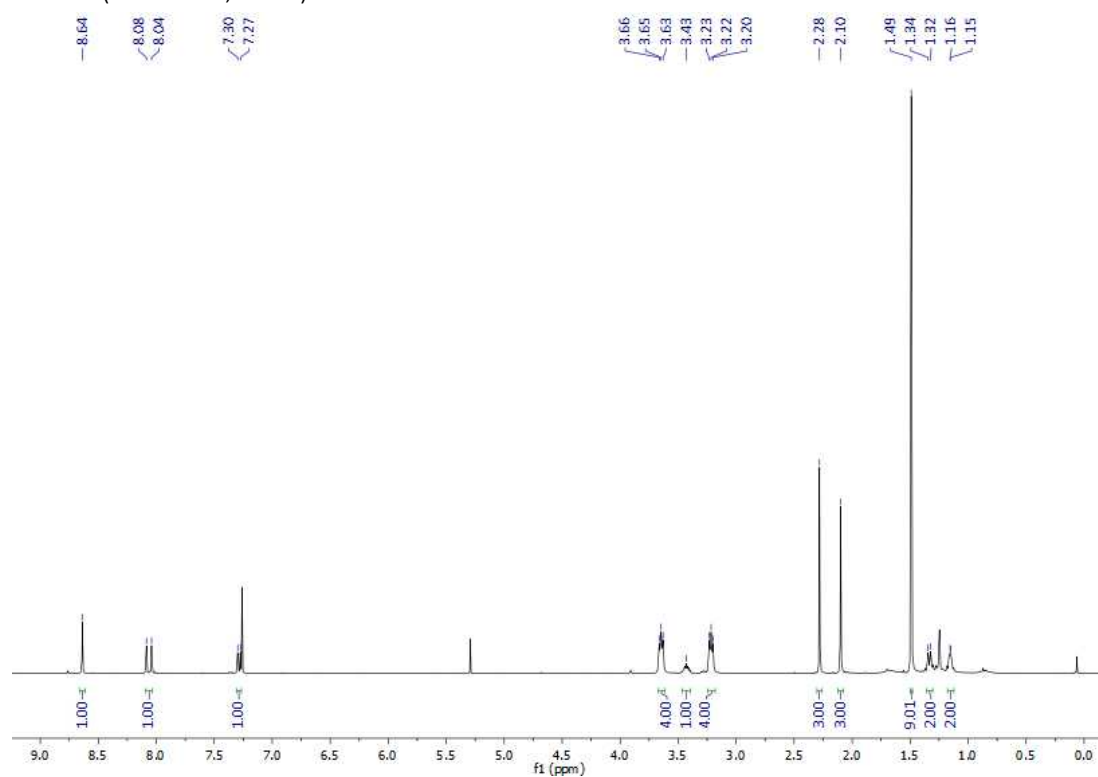
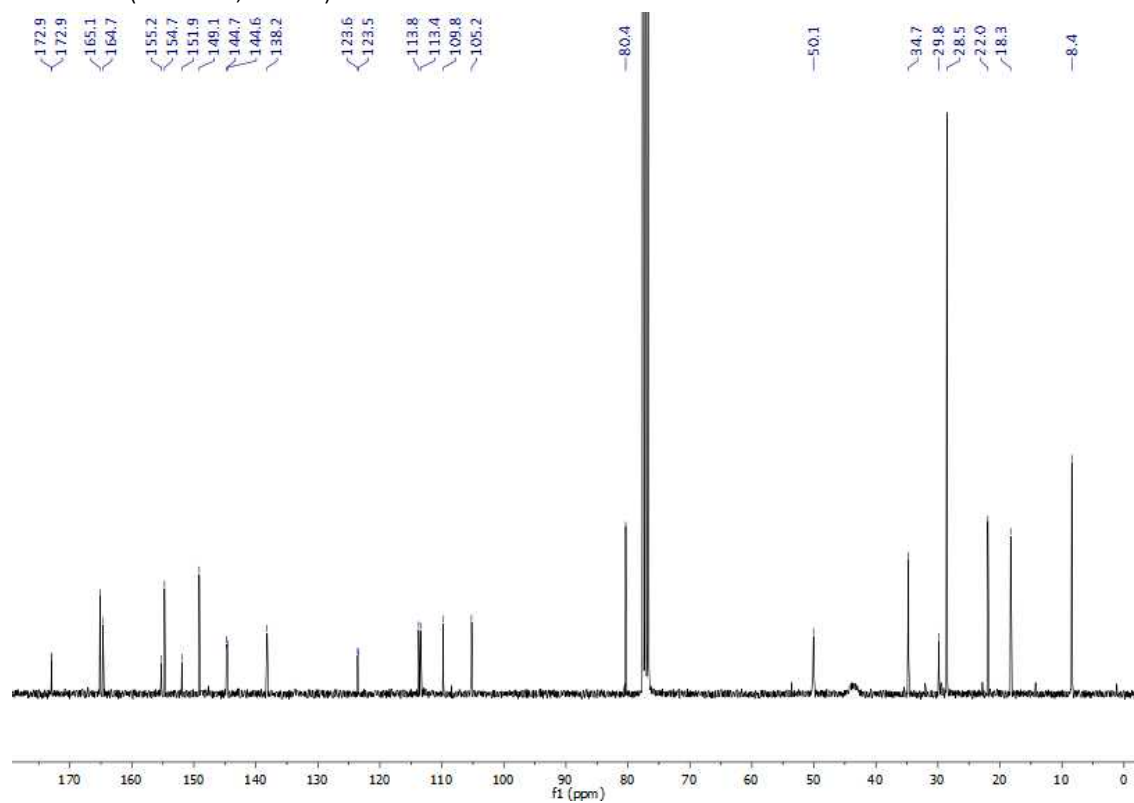
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.78 (s, 1H), 11.68 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.37 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.48 – 7.31 (m, 7H), 7.21 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 4.56 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 2.65 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.67 (s), 163.23 (s), 162.33 (s), 152.94 (s), 148.62 (s), 148.12 (s), 136.20 (s), 135.90 (s), 128.88 (s), 128.70 (s), 128.51 (s), 128.35 (s), 126.57 (s), 126.16 (s), 123.81 (s), 122.33 (s), 121.55 (s), 119.48 (s), 46.15 (s), 24.84 (s), 14.98 (s).

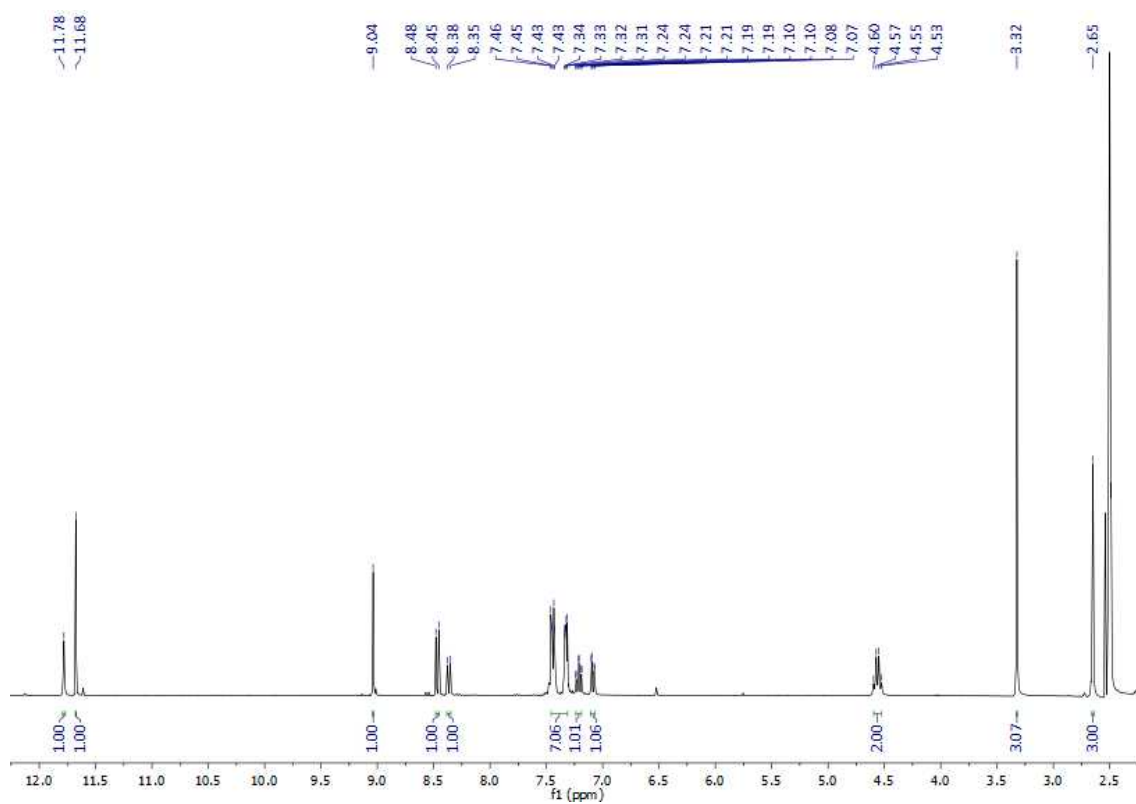
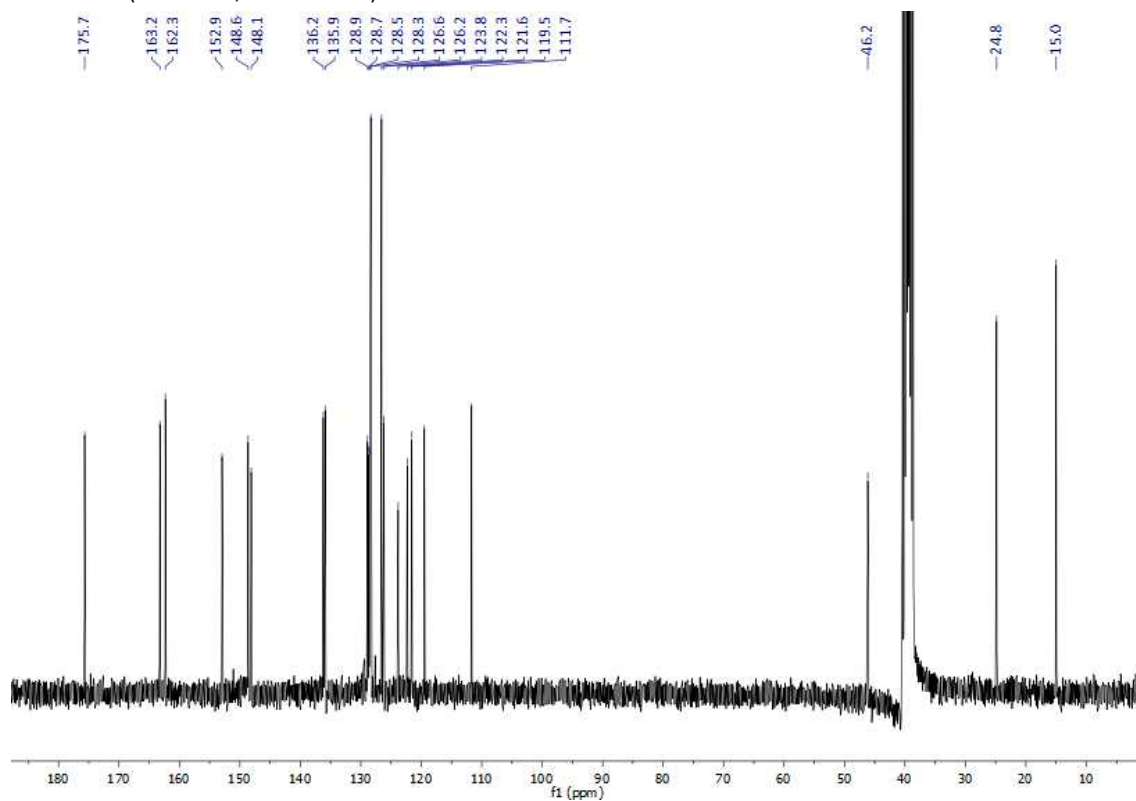
7. Anexos

7.1 RMN

Compuesto 4:

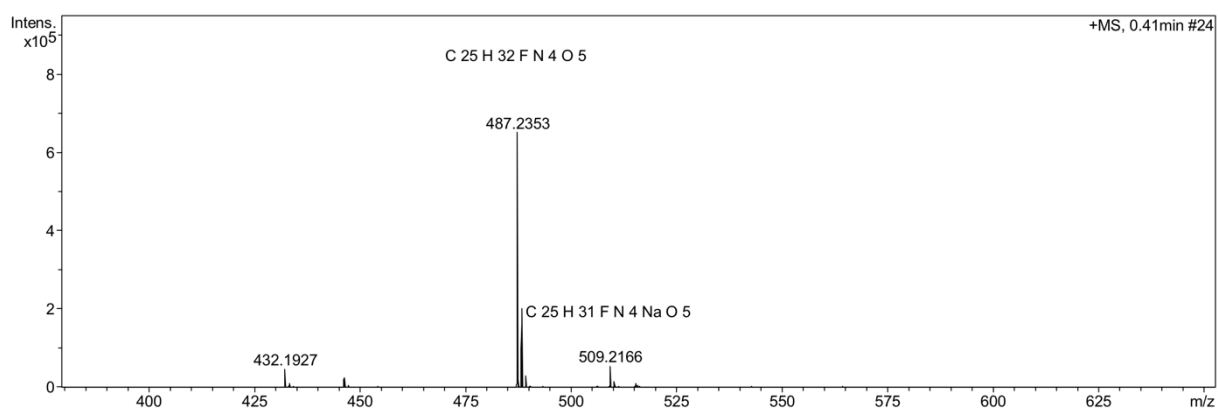
 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3)

Compuesto 7:

 ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

7.2 Espectros de masas

Compuesto 4:



Compuesto 7:

